نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۹، تابستان ۱۳۹۷
ص‌ص: ۷۱~۸۲

اثرات تغذیه‌ای عصاره چای سبز (Camellia sinensis) بر ویژگی‌های کیفی اسپرم خروس

- **سید کمال هاشمیان**
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
- **مرتضی مهری**(نویسنده مسئول)
استادیار، گروه علوم دامی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

تاریخ دریافت : اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : آبان ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۶۳۲۷۸۱۶۴
Email: mortezamehri@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22092/ asj.2017.109540.1399

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات تغذیه‌ای عصاره چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی بر برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس در یک دوره اسپرماتوژنز بود. آزمایش در قالب طرح اندازه‌گیری‌های تکرار شده با چهار تیمار و چهار تکرار انجام گرفت. چهار تیمار آزمایشی به ترتیب حاوی سطوح ۰، ۳۰، ٦۰ و ۹۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز در هر کیلوگرم جیره بودند. در روزهای صفر، ١٤، ۲۸، ٤۲، ٥٦ و ۷۰ آزمایش مایع منی جمع‌آوری و سپس خصوصیات حرکتی اسپرم شامل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، درصد خطی بودن جنبایی اسپرم، سرعت در مسیر منحنی، دامنه جابجایی سر اسپرم، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر، و سرعت در مسیر مستقیم و نیز میزان پیشرفت آپوپتوزیس بررسی شد. همچنین میزان شکست DNA اسپرم اندازه‌گیری شد. تیمارهای ۳ و ٤ به طور معنی‌داری (P<۰/۰٥) موجب کاهش آپوپتوزیس و بهبود برخی از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم از جمله دامنه‌ی جابجایی سر اسپرم شدند؛ با این حال تیمار ٤ در روزهای آخر آزمایش اثر منفی (نسبت به گروه شاهد) بر صفاتی همچون میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر و سرعت در مسیر مستقیم داشت (P<۰/۰٥). از طرفی سطح ۳۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز سبب بهبود میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر شد (P<۰/۰٥). نتیجه این مطالعه نشان داد که مصرف روزانه عصاره چای سبز به میزان ٦۰ میلی‌گرم در جیره، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، می‌تواند به بهبود برخی صفات حرکتی اسپرم و کاهش میزان آپوپتوزیس بیانجامد.

واژه‌های کلیدی: عصاره چای سبز؛ اسپرماتوژنز؛ اسپرم؛ خروس

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 119 pp: 71-82

Effects of Dietary Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Sperm Quality Parameters of Rooster

By: Seyed Kamal Hashemian[1], Morteza Mehri[2]*
1: M.Sc. Department of Animal Science, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2: Assistant professor, Department of Animal Science, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: February 2017 **Accepted: October 2017**

The objective of the present study was to investigate the dietary effects of green tea extract as a natural antioxidant on sperm quality parameters of rooster in the duration of an entire spermatogenesis cycle. Sixteen roosters divided into four aliquots and consumed diets supplemented with 0, 30, 60, 90 mg of green tea extract/kg of feed. On 0, 14, 28, 42, 56, 70 days after start semen fluid were collected and CASA for sperm motility, progressive motility, linearity (LIN), curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), nonapoptotic sperm and DNA fragmentation (by staining sperm with acridine orange). Treatments 3 and 4 reduced apoptotic sperm and improved some of sperm motion parameters such as ALH ($P<0.05$). However, in last days of experiment, treatment 4 had adverse effects on VAP and VSL ($P<0.05$). The least amount of green tea extract (30 mg/kg of feed) improved VAP ($P<0.05$). The results showed that daily consumption of 60 mg green tea extract/kg of feed, as a natural antioxidant, could possibly lead to improve some of sperm motion parameters and reduced apoptosis.

Key words: green tea extract; spermatogenesis; sperm; rooster.

مقدمه

مدیریت خروس و حفظ باروری آن در دوران تولید یکی از بزرگترین دغدغه‌های مدیران واحدهای پرورش مرغ مادر گوشتی است. باروری در گله‌های مادر گوشتی در آغاز دوره تولید مثلی می‌تواند به بالای ۹۵٪ نیز برسد، اما پس از رسیدن به سن ۴۵-۴۰ هفتگی به سرعت کاهش می‌یابد (Johnson, 2011). در این زمان حفظ سطح باروری خروس‌های گله از اهمیت زیادی برخوردار است. متاسفانه عدم به کارگیری روش صحیح، در مواردی منجر به از دست رفتن خروس‌های گله، کاهش شدید نطفه‌داری تخم‌مرغ و ضرورت جایگزینی خروس‌های گله با خروس‌های جوان می‌گردد که جدای از مخاطرات بهداشتی، معمولا نطفه‌داری گله به حد مطلوب برنمی‌گردد. فاکتورهای زیادی همچون شرایط محیطی و تغذیه‌ای بر باروری اسپرم تأثیر می‌گذارند (Hu *et al.*, 2015).

با وجود ضروری بودن اکسیژن برای موجود زنده، گونه‌های اکسیژن فعال[1] (ROS) تأثیر منفی بر عملکرد و ساختار سلول‌ها داشته و سبب بروز تنش اکسیداتیو می‌شوند (Devasagayam *et al.*, 2004). یکی از نشانه‌های مهم این نوع تنش در اسپرم، پراکسیداسیون چربی‌های غشاء است که موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی، و ایجاد شکستگی در DNA سلول‌های اسپرم شده و در نهایت کاهش

[1] Reactive Oxygen Species

توان باروری اسپرم را به همراه دارد (Rosenstrauch and Friedlander, 2007). از طرفی آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که قادر به جمع‌آوری و خنثی‌سازی اکسیژن فعال در داخل و خارج سلول‌های بدن می‌باشند. سلول‌های اسپرم طی روند اسپرماتوژنز، بخش زیادی از سیتوپلاسم خود را به همراه مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در آن از دست داده و در برابر تنش اکسیداتیو حساس می‌شوند (Aitken and Roman, 2008).

تنش اکسیداتیو می‌تواند آغازگر روند مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی اسپرم یا آپوپتوزیس[2] باشد. شکست DNA، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری، و افزایش نفوذپذیری غشاء اسپرم از جمله مهمترین عوامل آپوپتوزیس است (Partyka *et al.*, 2017). وجود مقادیر زیاد اسیدهای چرب سیرنشده در غشاء اسپرم، احتمال اکسید شدن و در پی آن افزایش نفوذپذیری غشاء اسپرم را بالا می‌برد. از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توان به منظور کاهش آپوپتوزیس در سلول و اندامک‌های مختلف سلولی بهره برد (Fattah *et al.*, 2017). در واقع مکانیسم‌های متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از آن وجود دارد که یکی از آنها استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط تنش است. آنتی‌اکسیدان‌ها مانع تولید ROS در پلاسمای منی شده و از اسپرم در برابر ROS محافظت می‌کنند (Malo *et al.*, 2010). برخی از گیاهان حاوی مقادیر زیادی آنتی‌اکسیدان طبیعی بوده و مشخص شده است که در پی مصرف آنها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Kahkonen *et al.*, 1999). بنظر می‌رسد عصاره چای سبز نیز که حاوی ترکیبات متعدد آنتی‌اکسیدانی است (Nakachi, 2000; Zhu *et al.*, 2004; Tsunki *et al.*, 2013; Senanayake, 2013) بتواند فراسنجه‌های کیفی منی[3] را به عنوان اصلی‌ترین شاخص تولید مثلی در خروس بهبود بخشد. بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز افزوده شده به جیره، بر باروری و کیفیت اسپرم خروس به عنوان یک راهکار در جهت بهبود عملکرد تولید مثلی خروس‌های گله مرغ مادر راس بود. فرضیه این تحقیق بر این اساس استوار بود که عصاره چای سبز با دارا بودن انواع ترکیبات فنولی خاص خود که آن را از سایر گیاهان دارویی متمایز می‌سازد از جمله کاتچین‌ها، قادر به ایجاد اثرات آنتی‌اکسیدانی بوده و استفاده آن در جیره‌های غذایی می‌تواند در طی یک دوره کامل اسپرماتوژنز باعث بهبود عملکرد تولید مثلی در اسپرم خروس شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۶ قطعه خروس سویه راس ۳۰۸ گله مادر گوشتی در سن ۲۴ هفتگی به قفس انفرادی منتقل و جیره‌ای مطابق با مشخصات کاتالوگ راهنمای سویه، دارای ۲۶۵۰ کیلو کالری انرژی و ۱۴٪ پروتئین دریافت نمودند. آزمایش در قالب طرح اندازه‌گیری‌های تکرار شده[4] با چهار تیمار و چهار تکرار، در مزرعه‌ای واقع در منطقه آبیک قزوین انجام گرفت. چهار تیمار آزمایشی به ترتیب حاوی سطوح ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز (*Camellia sinensis*) در هر کیلوگرم جیره بودند. فرمول جیره شاهد در جدول ۱ آمده است.

نمونه‌گیری اسپرم به روش ماساژ شکمی از روز صفر انجام شد و به فاصله هر ۱۴ روز یکبار (روزهای ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶ و ۷۰) نمونه-گیری تکرار شد (Burrows and Quinn, 1937). جهت نمونه‌گیری پس از مالش ناحیه شکمی خروس و در زمان انزال اسپرم، یک میکروتیوب زیر مجرای دفران قرار گرفته و اسپرم داخل آن جمع آوری شد. اسپرم به همراه اکستندر (به میزان ۵ برابر حجم اسپرم) به لوله فالکون منتقل و سپس در ظرف عایق محتوی یخ قرار گرفته و به سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. حجم بین ۰/۲تا ۰/۶ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و مورفولوژی غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد، در هر انزال به عنوان اسپرم طبیعی درنظر گرفته شد (Fattah *et al.*, 2017).

ویژگی‌های حرکتی اسپرم با استفاده از نرم‌افزار کاسا[5] (نسخه ۵/۲، میکرو اپتیک، بارسلونا، اسپانیا) آنالیز شد (Shahverdi *et al.*, 2014). به این منظور با استفاده از سمپلر، ۸ تا ۱۰ میکرولیتر از اسپرم روی لام مکلر چمبر[6] در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (نیکون،

[2] Apoptosis
[3] Semen Quality Parameters
[4] Repeated Measures
[5] Computer Assisted Sperm Analysis
[6] Makler Chamber

ECLIPSE E200، ژاپن؛ بزرگنمایی ۱۰۰) ویژگی‌های مورد نظر بررسی شد. فراسنجه‌های ارزیابی شده مربوط به تحرک در این برنامه شامل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، درصد خطی بودن جنبایی اسپرم (LIN)[۷]، سرعت در مسیر منحنی (VCL)[۸]، دامنه جابجایی سر اسپرم (ALH)[۹]، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر (VAP)[۱۰]، و سرعت در مسیر مستقیم (VSL)[۱۱] بود.

میزان شکست DNA نیز با استفاده از آزمون رنگ آمیزی آکریدین اورنج[۱۲] و بر اساس نفوذ این رنگ به DNA شکسته شده اسپرم و از طریق میکروسکوپ فلورسنت (المپیوس؛ BX51؛ توکیو، ژاپن؛ بزرگنمایی ۴۰۰) اندازه‌گیری شد (Lotfi *et al.*, 2017). این شاخص شامل درصدی از اسپرم‌ها است که رنگ نارنجی را در اثر شکست، ساطع می‌کنند. تعداد اسپرم‌هایی که با این رنگ نشان‌دار شده‌اند به عنوان درصد شکست DNA شمارش می‌شود (Chohan *et al.*, 2004).

آزمایش میزان پیشرفت آپوپتوزیس به روش ارزیابی جابجایی فسفاتیدیل سرین انجام و اسپرم‌ها براساس میزان حرکت فسفاتیدیل سرین به سمت غشاء پلاسمایی به ۴ گروه غیر آپوپتوتیک، آپوپتوتیک اولیه، آپوپتوتیک ثانویه و نکروتیک تقسیم شدند که در این پژوهش اسپرم‌های آپوپتوز نشده گزارش شد. به این منظور نمونه اسپرم به وسیله بافر کلسیم، که جزئی از کیت آنکسین-V بود (IQP، گرونینگن، هلند)، شستشو و ۱۰ میکرولیتر آنکسین-V به نمونه‌های منی افزوده شد. نمونه‌ها در جای تاریک و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر یدید پروپیدیوم به نمونه اضافه شد و میزان فعالیت آپوپتوز نمونه‌ها بوسیله فلوسایتومتری (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) ارزیابی شد (Lotfi *et al.*, 2017).

داده‌های حاصل از آزمایش به روش اندازه‌گیری‌های تکرار شده و با استفاده از نرم افزار آماری SAS ۹/۱ مورد آنالیز آماری قرار گرفت و جهت تشخیص و نمایان ساختن تفاوت بین میانگین‌ها، از اختلاف میانگین حداقل مربعات صفات مختلف (توکی-کرامر)، با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۵ درصد، تفاوت بین میانگین تیمارها مشخص شد. مدل آماری آزمایش به صورت زیر بود:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + \beta_1(t_k) + \beta_{2i}(\tau * t)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1,...,a;\ j = 1,...,b;\ k = 1,...,n$$

$y_{ijk} = ijk$ اُمین مشاهده، μ = میانگین کل، τ_i = اثر iاُمین تیمار، δ_{ij} = اشتباه تصادفی با میانگین صفر و واریانس σ^2_δ، β_1 = ضریب رگرسیون مشاهدات از دوره‌های اندازه‌گیری، β_{2i} = ضریب رگرسیون مشاهدات از اثر متقابل تیمار × دوره‌های اندازه‌گیری، $\varepsilon_{ijk} = (\tau * t)_{ik}$ = اشتباه تصادفی با میانگین صفر و واریانس σ^2، واریانس بین اندازه‌گیری‌ها درون خروس‌ها می‌باشد. همچنین، a= تعداد تیمارها؛ b= تعداد خروس مورد آزمایش؛ n= تعداد دوره‌های اندازه‌گیری می‌باشد.

نتایج

اثر سطوح مختلف عصاره چای سبز (شاهد، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خوراک) بر برخی فراسنجه‌های اسپرم در جدول ۲ ارائه شده است. بر این اساس اگرچه تفاوت معنی‌داری در درصد کل اسپرم‌های جنبا[۱۳]، کل اسپرم‌های پیش‌رونده، LIN ، VSL، و نیز آزمون شکست DNA مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما صفات ALH، VSL، VAP و درصد اسپرم آپوپتوز نشده تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره چای سبز قرار گرفت (P<۰/۰۵). نتایج نشان می‌دهد که عصاره چای سبز تأثیری منفی بر VSL داشته است به نحوی که با افزایش سطح عصاره، سرعت اسپرم در مسیر مستقیم کاهش یافت (P<۰/۰۵)؛ اما دو صفت حرکتی دیگر یعنی ALH و VAP به نحو متفاوتی تحت تاثیر قرار گرفتند، به این ترتیب که با افزایش سطح عصاره در جیره، ALH افزایش یافت و تفاوت بین تیمارهای سوم و چهارم با گروه شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). همچنین اگرچه بالاترین سطح عصاره نسبت به گروه شاهد، سبب کاهش VAP شد اما دو سطح دیگر (تیمارهای دوم و سوم) سبب افزایش میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر شدند (P<۰/۰۵).

[1] Motile Sperm

[7] Linearity
[8] Curvilinear velocity
[9] Amplitude of Lateral Head Displacement
[10] Average path velocity
[11] Straight line velocity
[12] Acridine Orange

افزودن عصاره چای سبز به جیره باعث کاهش تعداد اسپرم‌هایی شد که دچار آپوپتوزیس شدند (P<۰/۰۵). در این ارتباط تیمارهای سوم و چهارم تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند و تعداد اسپرم‌های آپوپتوتیک (مرده) در آنها کمتر بود (P<۰/۰۵). بررسی مقادیر جدول ۲ نشان می‌دهد که صفات ALH، VSL، VAP و درصد اسپرم آپوپتوز نشده (زنده) تحت تأثیر اثر متقابل عصاره چای سبز و زمان قرار گرفته‌اند (شکل‌های ۱ تا ۴). شکل ۱ نشان می‌دهد که سطوح بالای عصاره چای سبز در روز پایانی آزمایش سبب کاهش معنی‌دار VSL نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). بررسی شکل ۲ مشخص می‌کند که سطح ۳۰ میلی-گرم عصاره چای سبز، از روز ۲۸ تا پایان آزمایش سبب افزایش معنی‌دار VAP، و برعکس، بالاترین سطح عصاره سبب کاهش معنی‌دار آن در روزهای ۵۶ و ۷۰ نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). از طرفی در خصوص صفت ALH نیز در روزهای ۲۸، ۴۲ و ۵۶ تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده شد، به این ترتیب که دامنه جابجایی سر اسپرم در خروس‌های گروه شاهد در روزهای ۴۲ و ۵۶ نمونه‌گیری نسبت به گروه‌هایی که سطوح بالای عصاره-ی چای سبز (۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم) را دریافت کردند، به طور معنی-داری پایین‌تر بود (P<۰/۰۵) (شکل ۳). آنچه از شکل ۴ استنباط می‌شود مؤید این امر است که در روز ۱۴ آزمایش، سطوح ۲ و ۳ و در روزهای ۵۶ و ۷۰ آزمایش، سطح ۴ عصاره‌ی چای سبز سبب کاهش آپوپتوزیس اسپرم شدند (P<۰/۰۵).

بحث

افزایش غلظت ROSها در منی سبب افت عملکرد اسپرم و توانایی باروری آن می‌گردد (Baker *et al.*, 2006). پژوهش‌های فراوانی برای تعیین تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های گوناگون بر تولید مثل پستانداران انجام شده است (Berque *et al.*, 2003). اگرچه تاکنون اثرات انواعی از آنتی‌اکسیدان‌ها به صورت آزمایشگاهی در اسپرم خروس بررسی شده است (Berque *et al.*, 2003; Shahverdi *et al.*, 2014) اما مطالعه کمی روی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از طریق افزودن به جیره غذایی روی کیفیت اسپرم خروس انجام گرفته که از آن جمله می‌توان به عصاره گیاه رزماری (شکرانی و همکاران، ۱۳۹۵) و گل سرخ (احمدیان و همکاران، ۱۳۹۶) اشاره کرد. در نگاه کلی، نتایج این تحقیق از نظر صفاتی همچون درصد اسپرم‌های غیرآپوپتوتیک (زنده) و برخی ویژگی‌های حرکتی اسپرم با نتایج پژوهش صورت گرفته روی اثرات عصاره چای سبز در محیط آزمایشگاهی بر نگهداری اسپرم خروس مطابقت دارد (Daraji, 2011)؛ در این آزمایش Daraji (۲۰۱۱) نشان داد که سطح ۱۰ میلی‌لیتر عصاره چای سبز در محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق کننده به طور معنی‌داری کیفیت اسپرم خروس را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده و موجب حفظ تحرک و زنده‌مانی اسپرم در طول مدت ۷۲ ساعت نسبت به نمونه شاهد می-شود و دلیل آن را جلوگیری از پراکسیداسیون چربی دیواره اسپرم (که در زمان ذخیره‌سازی برون‌تنی[14] در اسپرم پرندگان مشاهده می‌شود) عنوان کرد. نتایج تحقیق مذکور و نیز پژوهش‌های صورت گرفته توسط شکرانی و همکاران (۱۳۹۵) و احمدیان و همکاران (۱۳۹۶) با پژوهش حاضر که به صورت درون‌تنی[15] انجام گرفته مطابقت دارد و هر دو حالت مؤید تأثیر مثبت آنتی‌اکسیدان-های موجود در چای سبز بر برخی صفات کیفی اسپرم خروس می‌باشد. گزارشی نیز در ارتباط با اثرات مثبت عصاره چای سبز بر ویژگی‌های حرکتی و زنده‌مانی اسپرم و نیز کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای آن در سگ ارائه شده است (Wittayarat *et al.*, 2013). در آزمایش حاضر، همانند گزارش شکرانی و همکاران (۱۳۹۵) و احمدیان و همکاران (۱۳۹۶)، ALH تحت تاثیر سطوح ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که برعکس بالاترین سطح عصاره چای سبز که سبب کاهش معنی‌دار VAP شد، سطوح پایین‌تر عصاره، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر را بهبود دادند. به نظر می‌رسد ترکیبات عصاره چای سبز در حالیکه از طریق حذف رادیکال‌های آزاد تأثیر معنی‌داری بر برخی از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم از جمله ALH و VAP گذاشته است، روی سایر فراسنجه‌های حرکتی از جمله LIN و VCL تاثیر قابل توجهی نداشته است. در این باره Baker و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که انکوباسیون اسپرم در فشارهای بالای اکسیژن سبب کاهش سرعت و تحرک اسپرم می‌شود و افزودن کاتالاز به محیط از ایجاد این اثر جلوگیری می‌نماید. وی پیشنهاد کرد که علت کاهش تحرک اسپرم‌ها، افزایش تولید پراکسید هیدروژن توسط اسپرماتوزوآ

[14] In vitro
[15] In vivo

تحت فشار بالای اکسیژن است. در سال ۱۹۸۹ برای اولین بار توسط Aitken و همکاران این فرضیه مطرح شد که مقادیر اندک رادیکال آزاد در تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیک اسپرم نقش دارد. به این ترتیب که افزایش تولید رادیکال آزاد باعث القاء پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم‌ها شده و دو اثر مهم را به همراه دارد، یکی از این اثرات، کاهش توانایی ترکیب اسپرم با تخمک و دیگری افزایش توانایی اسپرماتوزوآ برای اتصال به ناحیه شفاف[16] است. این پژوهشگران سپس آلفا-توکوفرول را به عنوان آنتی-اکسیدان به محیط افزوده و مشاهده کردند که جلوی بروز هر دوی این اثرات گرفته شد، بنابراین پیشنهاد نمودند که رادیکال آزاد تولید شده در اسپرماتوزوآ در فرایند فیزیولوژیک اتصال اسپرماتوزوآ به ناحیه شفاف نقش دارد (Aitken *et al.*, 1989). همچنین گزارش شده است که افزایش تشکیل رادیکال آزاد با کاهش تحرک اسپرم همراه است. این احتمال وجود دارد که افزایش تولید رادیکال آزاد در نهایت سبب کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونمی و عدم تحرک اسپرم شود. این حالت منجر به کاهش سیالیت غشاء که به نوبه خود برای ترکیب اسپرم- اووسیت لازم است، نیز می‌شود (Thiagarajan and Valivitan, 2009). این گزارش‌ها با یافته‌های تحقیق حاضر مبنی بر اثر مثبت غلظت‌های پایین و اثرات منفی غلظت بالای عصاره چای سبز در برخی فراسنجه‌های حرکتی مانند VAP و VSL مطابقت دارد به طوری‌که آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره چای سبز در غلظت‌های پایین به طور معنی‌داری کیفیت حرکتی اسپرم را از طریق حذف رادیکال‌های آزاد مازاد در محیط تحت تأثیر مثبت خود قرار داده در حالیکه در غلظت‌های بالا با خنثی‌سازی مقادیر اندک رادیکال آزاد باقیمانده در محیط که در تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیک اسپرم نقش دارد به صورت عکس عمل کرده و بر عملکرد حرکتی اسپرم تأثیری منفی می‌گذارد.

از طرفی به نظر می‌رسد میزان ۶۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بهترین سطح فعالیت آنتی اکسیدانی را پس از طی یک دوره کامل اسپرماتوژنز داشته است و از این طریق دامنه جابجایی سر اسپرم، که از اصلی‌ترین شاخص‌های حرکتی رو به جلو مربوط به سر اسپرم است (Boryshpolets *et al.*, 2013) را بهبود داده است. نتایج این پژوهش موید مطالعاتی است که حداقل زمان مورد نیاز برای القای اثرات آنتی‌اکسیدانی یک افزودنی خوراکی را یک دوره کامل اسپرماتوژنز می‌داند (Shi *et al.*, 2014). ذکر این نکته نیز ضروری است که سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی با تاثیر بر بخش‌های انرژی‌ساز برای حرکت اسپرم، همچون میتوکندری، باعث بهبود سازوکارهای حرکتی اسپرم می‌شوند (Liu *et al.*, 2015).

در مورد برخی صفات همچون سرعت اسپرم در مسیر مستقیم و میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر، سطح چهارم عصاره چای سبز (۹۰ mg/kg) به ویژه در اواخر دوره آزمایشی واجد اثرات منفی بود. در این زمینه نشان داده شده است که مصرف طولانی مدت مقادیر بیش از حد ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجب افزایش شدید سیالیت غشا (بیش از حد مطلوب) شده و اسپرم را مستعد آسیب می‌کند (Shoae and Zamiri, 2008). آنتی‌اکسیدان-های برون‌زادی از لحاظ وضعیت احیاء سلول، شمشیر دولبه محسوب می‌شوند. در مطالعات متعدد با آنتی‌اکسیدان‌های برون-زادی (به‌ویژه هنگامی‌که این ترکیبات در دُزهای بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند) نتایج متناقضی بدست آمده است. نوع، دُز و ماتریکس آنتی‌اکسیدان‌های برون‌زادی، عوامل مؤثر احتمالی هستند که توازن بین اثرات سودمند یا زیان‌آور این ترکیبات طبیعی را تعیین می‌کنند (Bouayed and Bohn, 2010).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که درصد اسپرم‌های غیرآپوپتوتیک (زنده) به طور معنی‌داری تحت‌تأثیر گروه‌های تیماری قرار گرفته و با افزایش میزان عصاره چای سبز در جیره، تعداد این اسپرم‌ها افزایش یافته است. شکل ۴ نشان می‌دهد که در روز ۴۲ آزمایش، بالاترین سطح چای سبز سبب افزایش معنی‌دار اسپرم‌های آپوپتوتیک شده (نسبت به گروه شاهد) که دلیل آن بر ما پوشیده است، اما در هر حال در روزهای ۵۶ و ۷۰ آزمایش، سطوح بالاتر چای سبز به طور معنی‌داری مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی اسپرم‌ها را کاهش داد ($P<0/05$). افزایش میزان اسپرم زنده در تیمار ۳ در روز پایانی آزمایش نشان دهنده بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح ۶۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز می‌باشد زیرا افزایش یکپارچگی غشای اسپرم تحت تاثیر میزان بهینه آنتی‌اکسیدان‌ها قرار گرفته و با افزایش میزان یکپارچگی غشای اسپرم، تغییرات آپوپتوزی دیرتر آغاز می‌شود که می‌تواند باعث حفظ بیشتر

[16] Pellucida Area

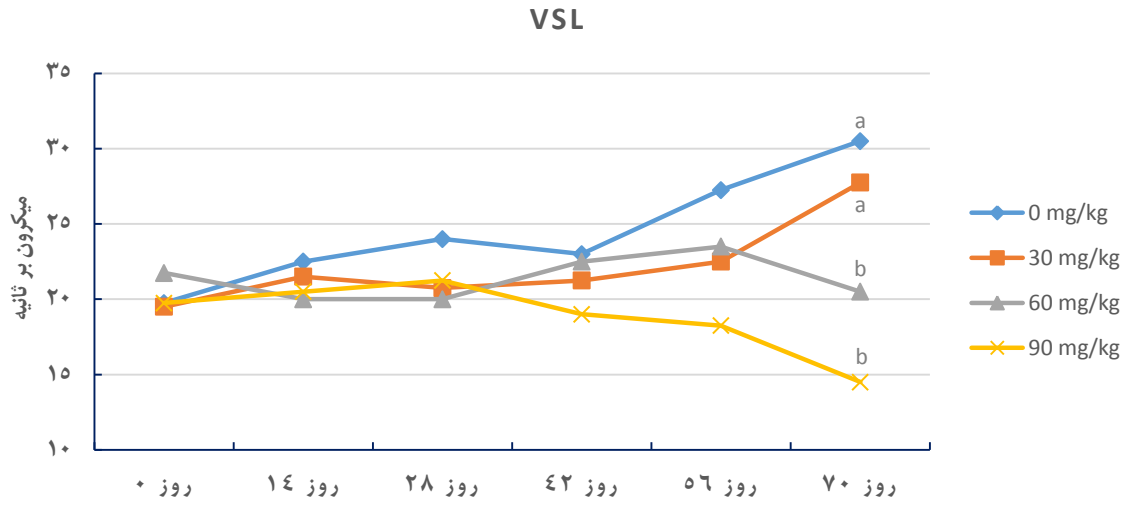
درصد اسپرم‌های زنده گردد (Shokri *et al.*, 2015). از سویی رادیکال‌های آزاد اثرات مخربی بر روندهای متابولیکی گذاشته و می‌تواند باعث شروع پراکسیداسیون لیپید و تخریب ساختار DNA اسپرم و در نهایت منجر به مرگ سلول شوند (Berque *et al.*, 2003). لذا بهبود خصوصیات اسپرم مانند کاهش میزان اسپرم‌های آپوپتوزی در این مطالعه می‌تواند به دلیل حذف رادیکال‌های آزاد باشد. در پژوهشی نشان داده شد که افزودن عصاره رزماری به جیره خروس، درصد اسپرم‌های مرده را کاهش داد (شکرانی و همکاران، ۱۳۹۵). پژوهش‌هایی نیز نشان داده‌اند که اسپرم در محیط اطراف خود جهت تولید ATP نیاز به اکسیژن زیادی دارد به طوری که اکسیژن مربوطه نیز ممکن است منجر به تولید رادیکال‌های آزاد شود و در نتیجه سبب تخریب غشاء اسپرم گردد. این موضوع می‌تواند بر غیر نرمال بودن و مرگ اسپرم‌ها تاثیرگذار باشد (Thuwanut *et al.*, 2008). معمار و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند ویتامین E با جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب سیرنشده‌ی اسپرم، موجب کاهش تراوایی غشاء و افزایش زنده‌مانی اسپرم می‌شود. نتایج این تحقیق قابل تعمیم به مطالعه حاضر می‌باشد زیرا سطوح سوم و چهارم عصاره چای سبز به طور معنی‌داری میزان مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی اسپرم (آپوپتوزیس) را پس از طی دوره اسپرماتوژنز کاهش داده است ($P<0/05$).تحقیقی دیگر نشان می‌دهد که اضافه شدن کاتالاز به محیط رقیق سازی اسپرم همستر باعث بهبود معنی‌دار توانایی لقاح آن در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد (Aitken *et al.*, 2004). نتایج مطالعات نیز موید این موضوع است که اسپرم نیازمند داشتن یک مکمل آنتی‌اکسیدانی است، زیرا تمامی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در سیتوپلاسم قرار دارد و اسپرم در طی روند تکامل حجم قابل توجهی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد و لذا شدیدا تحت تاثیر تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد. از طرف دیگر وجود اسیدهای چرب سیرنشده در غشاء اسپرم نیاز آن را به وجود آنتی‌اکسیدان قوی‌تر می‌کند زیرا این اسیدهای چرب سیرنشده می‌توانند به صورت تصاعدی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد در اطراف اسپرم شوند (Saleh and Agarwal, 2002). بررسی نتایج نشان داد که سطوح مختلف چای سبز هیچ تاثیری روی شکست DNA نداشته‌اند. همانگونه که ذکر شد رادیکال‌های آزاد می‌توانند سبب تخریب ساختار DNA اسپرم شوند. در مطالعه حاضر بهبود خصوصیات اسپرم مانند کاهش آپوپتوزیس می‌تواند به دلیل حذف این رادیکال‌های آزاد باشد، گرچه اثری روی شکست DNA اسپرم نداشته است (Berque *et al.*, 2003).

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که مصرف عصاره چای سبز در سطح ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره موجب بهبود برخی صفات اسپرم همچون کاهش میزان آپوپتوزیس و افزایش ALH، پس از گذارندن یک دوره کامل اسپرماتوژنز می‌گردد. مشاهدات ما بیانگر این مطلب است که چای سبز با دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی مناسب می‌تواند در جهت محافظت اسپرم خروس از رادیکال‌های آزاد به عنوان یک مکمل تغذیه‌ای در یک بازه زمانی ۷۰ روزه مورد استفاده قرار بگیرد.

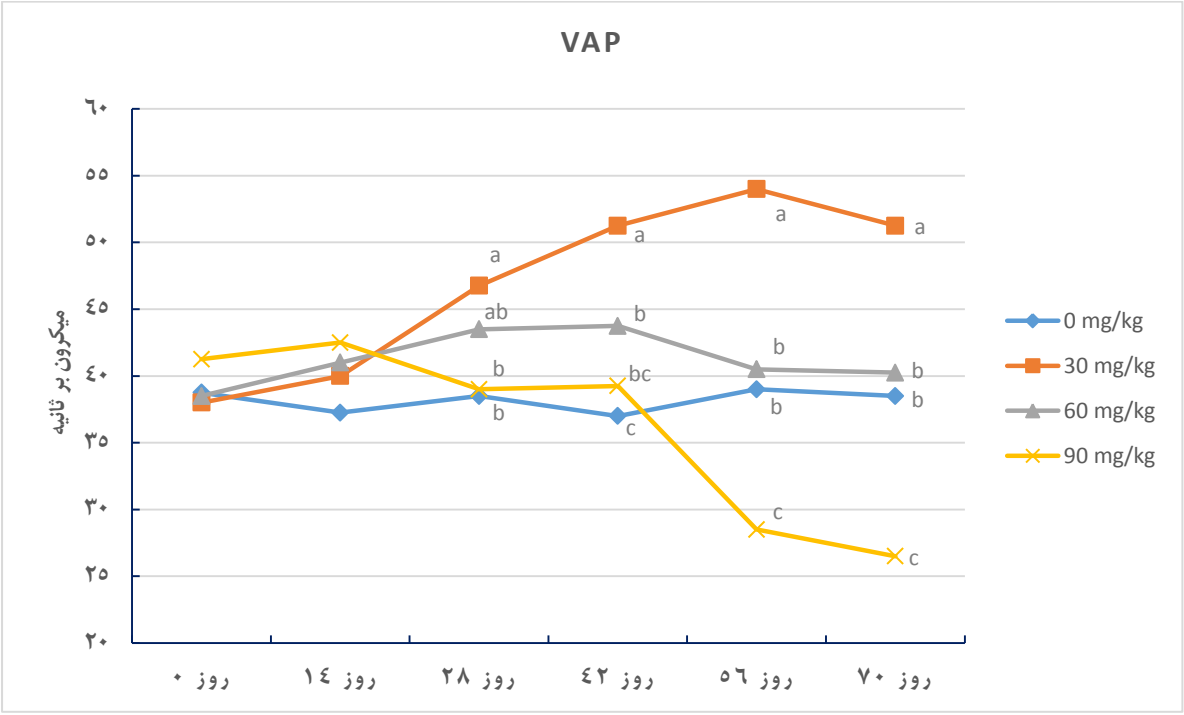
نتیجه گیری

با توجه به اینکه هدف اصلی این پژوهش یافتن راهکاری تغذیه‌ای به منظور حفظ باروری خروس‌های گله‌ی مادر (که با افزایش سن دچار افت باروری می‌شوند) بود، در مجموع به نظر می‌رسد افزودن عصاره چای سبز (که واجد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است) به جیره خروس‌ها سبب بهبود برخی از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم همچون دامنه‌ی جابجایی سر اسپرم و نیز کاهش میزان اسپرم‌های آپوپتوتیک می‌شود؛ با این حال افزودن طولانی مدت سطح بالای این عصاره ظاهرا سبب بروز اثراتی منفی در برخی از دیگر صفات حرکتی اسپرم همچون میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر و سرعت اسپرم در مسیر مستقیم می‌شود.

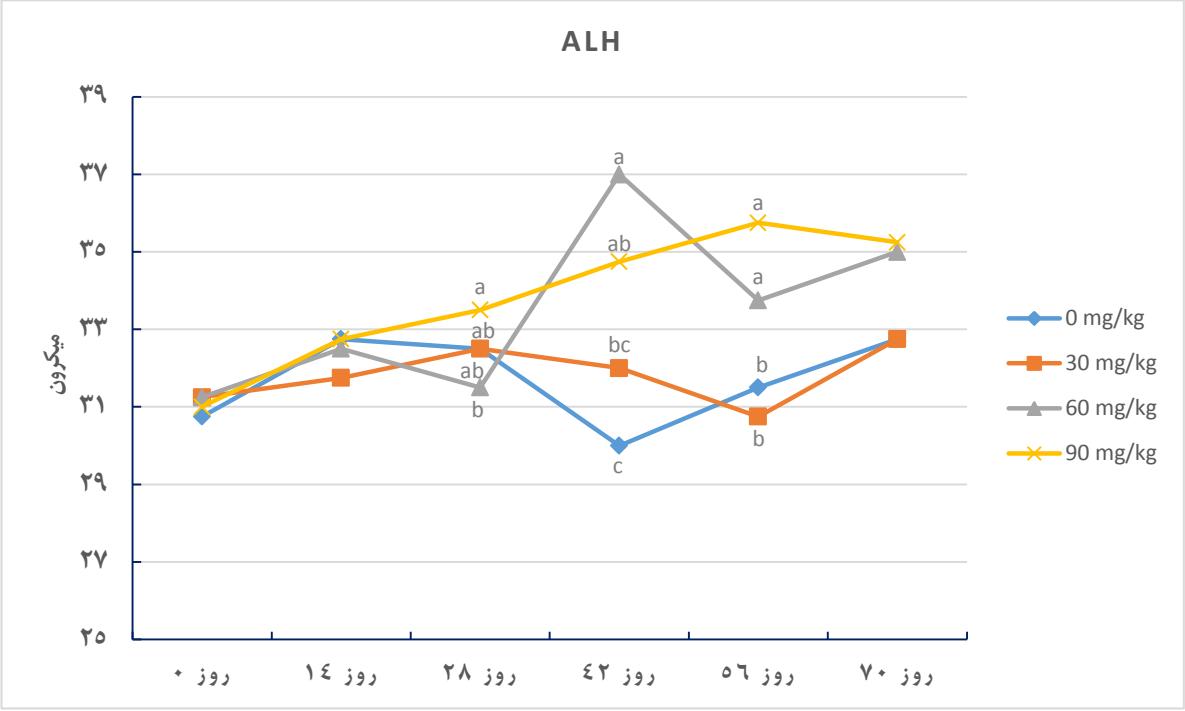
شکل ۱: اثر متقابل سطوح مختلف عصاره چای سبز و زمان (هفته) بر سرعت اسپرم در مسیر مستقیم (میکرون در ثانیه)



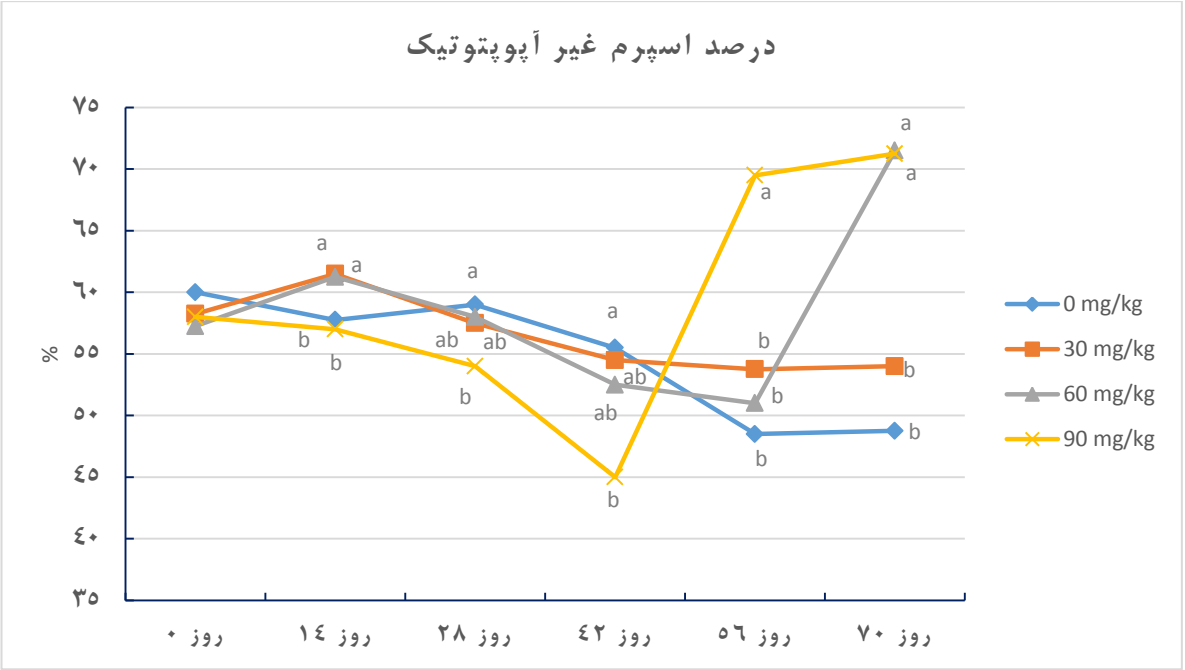
شکل ۲: اثر متقابل سطوح مختلف عصاره چای سبز و زمان (هفته) بر میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر (میکرون در ثانیه)



شکل ۳: اثر متقابل سطوح مختلف عصاره چای سبز و زمان (هفته) بر دامنه جابجایی سر اسپرم (میکرون)



شکل ۴: اثر متقابل سطوح مختلف عصاره چای سبز و زمان (هفته) بر درصد اسپرم‌های غیر آپوپتوتیک



جدول ۱: ترکیبات مواد خوراکی و تجزیه شیمیایی جیره

اقلام خوراکی (٪ جیره)		ترکیب جیره	
ذرت	۲۹/۸	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	۲۶۰۰
گندم	۲۰/۴	پروتئین خام (٪)	۱۲
جو	۲۰	لایزین (٪)	۰/۵۱
سبوس گندم	۱۹/۳	متیونین (٪)	۰/۳۵
کنجاله سویا ۴۴٪	۵/۳	متیونین + سیستئین (٪)	۰/۵۱
روغن سویا	۰/۶	ترئونین (٪)	۰/۴
سنگ آهک	۲/۵	کلسیم (٪)	۰/۷
مونو کلسیم فسفات	۰/۹	فسفر در دسترس (٪)	۰/۳۵
مکمل معدنی و ویتامینی*	۰/۵		
نمک	۰/۲۵		
جوش شیرین	۰/۱۵		
ویتامین آ، ای، D۳	۰/۳		

* در هر کیلوگرم جیره حاوی: ویتامین آ، ۱۲۰۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین D۳، ۳۵۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین ای، ۱۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین K۳، ۵ میلی گرم؛ تیامین، ۳ میلی گرم؛ ریبوفلاوین، ۱۲ میلی گرم؛ نیاسین، ۱۵ میلی گرم؛ پانتوتنیک اسید، ۵۵ میلی گرم؛ پیریدوکسین، ۴ میلی گرم، B۱۲، ۰/۰۴ میلی گرم؛ بیوتین، ۰/۲۵ میلی گرم؛ کولین، ۱ میلی گرم. آهن، ۵۰ میلی گرم؛ منگنز، ۱۲۰ میلی گرم؛ روی، ۱۱۰ میلی گرم؛ مس، ۱۰ میلی-گرم؛ ید، ۲ میلی گرم؛ سلنیوم، ۰/۳ میلی گرم.

جدول ۲. اثر افزودن عصاره چای سبز به جیره، بر برخی از فراسنجه‌های اسپرم خروس (میانگین حداقل مربعات±SD)

	عصاره چای سبز (میلی گرم در کیلوگرم جیره)					P-value		
صفت	۰	۳۰	۶۰	۹۰	جیره	زمان	جیره × زمان
اسپرم‌های جنبا (٪)	۷۱/۸۳±۵/۴۴	۷۱/۲۵±۶/۱۵	۶۸/۹۵±۶/۸۲	۶۹/۰۸±۴/۹۲	NS	NS	NS
اسپرم‌های دارای حرکت پیش رونده (٪)	۱۷/۹۱±۳/۲۳	۱۸/۲۵±۱/۹۸	۱۸/۳۳±۲/۱۸	۱۹/۴۵±۲/۴۳	NS	NS	NS
VSL	۲۴/۵۰±۴/۲۷^{a}	۲۲/۲۰±۳/۱۵^{b}	۲۱/۳۷±۲/۴۳^{b}	۱۸/۸۷±۳/۰۸^{c}	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۳	۰/۰۱۰۶
LIN	۴۳/۱۲±۳/۱۳	۴۱/۶۲±۲/۵۳	۴۲/۱۶±۳/۰۲	۴۱/۴۵±۲/۴۱	NS	NS	NS
ALH	۳۱/۷۰±۱/۸۱^{b}	۳۱/۸۳±۱/۵۲^{b}	۳۳/۵۰±۳/۵۵^{a}	۳۳/۸۳±۲/۰۴^{a}	۰/۰۰۶۴	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۱
VCL	۲۸/۹۱±۳/۱۵	۲۸/۲۵±۳/۹۰	۳۰/۵۰±۳/۸۹	۲۹/۱۲±۳/۳۰	NS	NS	NS
VAP	۳۸/۱۶±۱/۶۶^{c}	۴۶/۸۷±۶/۴۷^{a}	۴۱/۲۵±۲/۷۹^{b}	۳۶/۱۶±۷/۰۳^{d}	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
شکست DNA	۸/۰۸±۰/۷۴	۷/۱۶±۰/۹۲	۸/۰۴±۰/۹۷	۶/۶۶±۱/۲۴	NS	NS	NS
اسپرمهای غیر آپوپتوتیک (٪)	۵۴/۹۱±۵/۸۷^{c}	۵۶/۵۸±۴/۴۷^{bc}	۵۸/۵۸±۷/۷۷^{ab}	۵۹/۱۳±۹/۶۷^{a}	۰/۰۱۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است

منابع

احمدیان، ع. ا. و مهری، م. (۱۳۹۶). اثرات تغذیه‌ای عصاره گل سرخ *(Rosa damascene)* بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد خروس. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک. در نوبت چاپ.

معمار، م.، زارع شحنه، ا.، زین‌الدینی، س.، کهرام، ح. و ضمیری، م. ج. (۱۳۹۱). اثر ملاتونین و ویتامین E بر ویژگی‌های منی یخ زده خروس‌های بومی استان فارس. تغذیه و سلامت. ۴۳ (۳): ۳۷۹-۳۹۱.

شکرانی، ب.، مهری، م.، فتاح، ا.، شرفی، م. و شیرمحمد، ف. (۱۳۹۵). مطالعه تأثیر استفاده از اسانس رزماری در جیره، بر کیفیت منی خروسهای مادر گوشتی. تولیدات دامی. ۱۸ (۴): ۸۵۳-۸۶۵.

ضمیری، م. ج.، هاشمی، م. و بوستانی، ع. (۱۳۸۴). اثرات چندین رقیق کننده برای نگهداری اسپرم خروس‌های بومی در دو دما. علوم کشاورزی ایران. ۳۶ (۳): ۶۰۳-۶۱۲.

Aitken, R.J. and Roman, S.D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1(1):15–24.

Aitken, R.J., Baker, M.A. and Sawyer, D. (2004). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive Biomedicine Online.* 7: 65–70.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S. and Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*. 41:183–197.

Baker, H.W., Brindle, J., Irvine, D.S. and Aitken, R.J. (2006). Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertility and Sterility.* 65:411–419.

Boryshpolets, S., Kowalski, R.K., Dietrich, G.J., Dzyuba, B. and Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*. 80(7):758-765.

Bouayed, J. and Bohn, T. (2010). Exogenous Antioxidants: Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3:228-237.

Breque, C., Surai, P. and Brillard, J.P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 66:314-323.

Burrows, W.H. and Quinn, J.P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science.* 26:19-24.

Chohan, K.R., Griffin, J.T. and Carrell, D.T. (2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*. 36(5):321-6.

Daraji, H.A. (2011). Effect of diluent supplementation with different levels of green tea on roosters' semen quality during in vitro storage. International Journal of Planet. *Animal and Enviromental Science*. 1(3):51-56.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi,S.S. and Lele, R.D. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of Association of Physicians of India (JAPI).* 52:794-804.

Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V. and Najafi, A. (2017). Carnitine in rooster semen cryopreservation: flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*. 74:148–153.

Hu, J., Chen, J.L., Wen, J., Zhao, G.P., Zheng, M.Q., Liu, R.R., et al. (2013). Estimation of the genetic parameters of semen quality in Beijing-You chickens. *Poultry Science.* 92(10):2606-2612.

Johnson, R. (2011). The effect of dietary additives on performance traits of white leghorn roosters. *Poultry Science*. 81:495-50.

Kahkonen, M., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K. and Kujla, T.S. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:3954-3962.

Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D. and Li, J. (2015). Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (Pagrus major) sperm cryopreservation. *Fish physiology and biochemistry*. 41(2):413-422.

Lotfi, S., Mehri, M., Sharafi, M. and Masoudi, R. 2017. Hyaluronic Acid Improves Frozen-thawed Sperm Quality and Fertility Potential in Rooster. *Animal Reproduction Science.* 184:204-210.

Malo, C., Gill, L. and Martin, F. (2010). Anti-oxidant supplementation improve boar sperm charasterictics and fertility after cryopreversation: comparison between cysteine and rosemary. *Cryobiology*. 61:142-147.

Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M. and Imai, K. (2000). Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors.* 13(1-4):49-54.

Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J. and Niżański, W. (2017). The effect of l-carnitine, hypotaurine, and taurine supplementation on the quality of cryopreserved chicken semen. *BioMed Research International*. 2017:1-8

Rosenstrauch, A. and Friedlander, M. (2007). Spermatozoa retention causes the normal reduction of fertility in aging roosters. *Acta Microscopica*. 16(1-2):189-190.

Saleh, R. and Agarwal, A. (2002). Oxidant stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology.* 23:737-752.

SAS, Statistical Analysis System. (2001). SAS User's Guide. SAS, Institute Inc., Cary North California, USA.

Senanayake, S.P.J. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications. *Journal of functional foods.* 5(4):1529-1541.

Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A., Esmaeili, V., Sharbatoghli, M., Janzamin, E., Hajnasrollahi, M. and Mostafayi, M. (2014). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*. 83(1):78-85.

Shi, L., Zhao, H., Ren, Y., Yao, X., Song, R. and Yue, W. (2014). Effects of different levels of dietary selenium on the proliferation of spermatogonial stem cells and antioxidant status in testis of roosters. *Animal reproduction science*. 149(3):266-272.

Shoae, A. and Zamiri, M.J. (2008). Effect of butylated hydroxytoluene on bull sperm frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science*. 104:414-418.

Shokri, S., Ziaeipour, S., Ganji, H.B. and Nejatbakhsh, R. (2015). P-16: Antiapoptotic and Antioxidant Effect of Insulin Like Factor-3 on Sperm of Fertile Men After Cryopreservation. *International Journal of Fertility and Sterility*. 9:2-5.

Thiagarajan, R. and Valivitan, T. (2009). Antioxidant properties of green and black tea. *Experimental Eye Research*. 73(3):393-401.

Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M. and Axnér, E. (2008). The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*. 70(2):233-40.

Tsuneki, H., Ishizuka, M., Terasawa, M., Wu, J.B., Sasaoka, T. and Kimura, I. (2004). Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacology*. 4:18–27.

Wittayarat, M., Ito, A., Kimura, T., Namula, Z., Lu, V.V., Do, L.T. et al. (2013). Effects of green tea polyphenol on the quality of canine semen after long-term storage at 5°C. *Reproductive Biology.* 13(3):251-4.

Zhu, N., Sang, S., Huang, T., Bai, N., Yang, C.S. and Ho, C.T. (2000). Antioxidant chemistry of green tea catechins: oxidation products of epigallocatechin gallate and epigallocatechin with peroxidase. *Journal of Food Lipids.* 7:275–282.